

2015 年度修士論文要旨
ビスフェノール A 投与による脳内一酸化窒素発生と
ニトロシル化による PDI 活性阻害の検討

関西学院大学大学院理工学研究科
生命科学専攻 今岡研究室 八木 英里奈

【研究目的】 Bisphenol A (BPA) は内分泌かく乱物質であり、BPA を周産期のマウスに暴露すると、その母マウスから産まれた仔マウスは多動性や行動異常を示すことや、アフリカツメガエル胚の頭部の低形成や背骨の湾曲を引き起こすことなどから脳神経系に影響を及ぼすことが明らかとなっている。しかしそのメカニズムは明らかとなっていない。そこでこのメカニズムの解明を目的にラット脳から BPA 結合タンパク質を探索した結果、Protein disulfide isomerase (PDI) が同定された。PDI は Anfinsen らによって発見された、新生及び変性タンパク質のフォールディングを触媒する(イソメラーゼ活性)タンパク質である。先行研究において BPA は PDI に結合しイソメラーゼ活性を阻害することが明らかとなっている。最近の研究でパーキンソン病やアルツハイマー病などの脳神経変性疾患患者の脳内の PDI には一酸化窒素が結合(ニトロシル化)していることで活性を阻害していることが報告された。そこで本研究では、BPA が脳において一酸化窒素を発生させることで PDI のニトロシル化や機能阻害をしているかどうか検討することを目的としている。まず第一章では BPA がラット脳内の PDI をニトロシル化するのか、またそれによる PDI のイソメラーゼ活性の変化の検討を行った。第二章では BPA が脳神経系に与える影響を検討するため、神経細胞モデルとして用いられているラット副腎髄質由来褐色細胞腫(PC12細胞)を用いて BPA が神経突起形成に与える影響及び PDI のニトロシル化について検討した。

【実験方法】 ラットに BPA を投与して脳ミクロソームを単離し、PDI のニトロシル化、イソメラーゼ活性を検討した。Biotin-Switch 法によりニトロシル化された PDI を検出した。PC12 細胞に神経成長因子である NGF を添加し、神経突起伸長を検討した。

【実験結果と考察】 BPA 投与ラット脳ミクロソーム内の PDI はニトロシル化されており、さらにミクロソームのイソメラーゼ活性は低下していることを明らかにした。よって BPA は PDI のニトロシル化を促進することが示唆された。次に単離したラット脳ミクロソーム、精製した PDI タンパク質に一酸化窒素供与体である NOC7 で処理し、PDI のニトロシル化やイソメラーゼ活性の低下を検討した。その結果、PDI のニトロシル化の上昇とイソメラーゼ活性の低下を確認できた。このことから、一酸化窒素の発生により PDI は直接ニトロシル化を受け、活性が低下することが示された。さらに BPA が PC12 細胞の神経突起伸長に与える影響を検討した結果、BPA の濃度依存的に阻害された。PC12 細胞に NOC7 を曝露した結果、神経突起伸長は阻害された。また一酸化窒素合成酵素である NOS の阻害剤である L-NMMA の濃度依存的に BPA による神経突起伸長の阻害が抑制された。このことから BPA による神経突起伸長の阻害は一酸化窒素の発生を介していることが示唆された。PC12 細胞に BPA を曝露し、ニトロシル化 PDI の検出を行った結果、PC12 細胞内でも PDI は BPA によりニトロシル化されることが示された。また BPA と L-NMMA を同時に曝露すると PDI のニトロシル化は抑制された。このことから BPA は一酸化窒素の発生を介して PDI のニトロシル化を促進することが示された。PDI が神経突起伸長に関与するのか検討することを目的に PDI の阻害剤であるバシトラシンが PC12 細胞の神経突起伸長に与える影響を検討した。その結果、バシトラシン曝露により神経突起伸長は阻害され、PDI は神経突起伸長に重要である可能性が示唆された。これらの結果より BPA による PDI などのタンパク質のニトロシル化を介した機能障害が脳神経系に影響を与える一つのメカニズムとなる可能性が示唆された。